

培养组学方法优化

Optimization of Culturomics Methods

常宇骁[#], 侯凤仪[#], 毕玉晶^{*}, 杨瑞馥^{*}

军事科学院军事医学研究院, 微生物流行病学研究所, 北京

*通讯作者邮箱: byj7801@sina.com; 13801034560@163.com

[#]共同第一作者/同等贡献

引用格式: 常宇骁, 侯凤仪, 毕玉晶, 杨瑞馥. (2021). 培养组学方法优化. Bio-101 e2003639. Doi: 10.21769/BioProtoc. 2003639.

How to cite: Change, Y. X., Hou, F. Y., Bi, Y. J. and Yang, R. F. (2021). Optimization of Culturomics Methods. Bio-101 e2003639. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003639. (in Chinese)

摘要: 培养组学是一种采用多种培养条件, 利用 MALDI-TOF 质谱和 16S rRNA 基因测序鉴定细菌种属的培养方法。人类肠道菌群中仍有大部分细菌难以培养, 目前培养组学的发展给这些难以培养的细菌带来了新的希望。本实验方法通过延长预培养时间, 选择 7 个固定时间点, 按颜色、形态、大小挑取单克隆的方法来分离预培养混合菌液, 并通过补充培养基、添加抑制剂两个额外的培养条件来增加分菌种类和数量。通过本实验方法可以有效的增加分离培养的菌种数目, 并在保证尽可能不减少分出菌种数量的前提下降低工作量, 同时增加了发现细菌新种/属的可能性。

关键词: 肠道菌群, 培养组学, 方法优化

材料与试剂

1. 50 ml 无菌离心管 (Corning, catalog number: 430828)
2. 血培养瓶 (郑州安图公司, catalog number: BC120)
3. 脱脂绵羊血 (北京宝特医疗有限公司, catalog number: H0011)
4. 瘤胃液 (ELITE-MEDIA, catalog number: A386-01)
5. 半胱氨酸 (Cysteine) (Sigma, catalog number: C7352-25g)
6. 刃天青 (Resazurin) (Sigma, catalog number: R7017-5g)

7. 血红素 (Haemin) (Sigma, catalog number: 51280-5g)
8. 生物素 (Biotin) (Sigma, catalog number: B4639-100mg)
9. 钴胺素 (Cobalamin) (Sigma, catalog number: V2876-250mg)
10. 对氨基苯甲酸 (p-aminobenzoic acid) (Sigma, catalog number: A9878-5g)
11. 叶酸 (Folic acid) (Sigma, catalog number: F7876-1g)
12. 吡哆胺 (Pyridoxmine) (Sigma, catalog number: P9158-1g)
13. 胰蛋白冻 (Casitone) (Sigma, catalog number: 6054)
14. 酵母提取物 (Yeast extract) (OXOID, catalog number: LP0021)
15. 碳酸氢钠 (NaHCO_3) (沪试, catalog number: 144-55-8)
16. 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) (沪试, catalog number: 2139900)
17. 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) (沪试, catalog number: 7778-77-0)
18. 氯化钠 (NaCl) (西陇科学, catalog number: 7647-14-5)
19. 硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (沪试, catalog number: 10034-99-8)
20. 氯化钙 (CaCl_2) (西陇科学, catalog number: 10043-52-4)
21. 硫胺素 (Thiamine) (Sigma, catalog number: T4625)
22. 核黄素 (Riboflavin) (Sigma, catalog number: R-4500)
23. 葡萄糖 (沪试, catalog number: 14431-43-7)
24. 琼脂糖 (欣经科, catalog number: 4002)
25. 裂解液和质谱基质 (郑州安图公司)
26. DNeasy blood&tissue (QIAGEN, catalog number: kit 69506)
27. 抑制剂 CHIR-090 (北京百奥莱德公司)
28. YCFA 培养基 (见溶液配方)

仪器设备

1. 粪便收集器 (Norgen Biotek, model: NGB-27650)
2. 100 ml 锥形瓶 (Hario, model: 100ml)
3. 灭菌锅 (Yamato, model: SQ510C)
4. MALDI-TOF 质谱仪 (郑州安图公司, model: Autof MS1000)
5. 恒温震荡培养箱 (宿州培英实验设备有限公司, model: HZQ-F160)

6. 厌氧培养箱 (英国 Ruskin 公司, model: INVIVO2 400)
7. 涡旋仪 (其林贝尔仪器制造有限公司, model: UNAIR)
8. 恒温培养箱 (天津市泰斯特仪器有限公司, model: DH3600AB)
9. 全温震荡培养箱 (宿州培英实验设备有限公司, model: HZQ-F160)

实验步骤

1. 取样

- 1.1 粪便样本: 提前将粪便收集器高压灭菌, 同时准备 50 ml 无菌离心管, 加入 20 ml 无菌 PBS。用粪便收集器, 在洁净环境下取新鲜样本, 随后将重量大概为 1 g 的样本放入事先准备好的装有 PBS 的离心管里, 进行重悬混匀, 然后静置 5 min。上述操作按照需氧或厌氧条件, 分别在生物安全柜或厌氧培养箱中操作完成。
- 1.2 组织样本: 按照实验目的, 严格按照无菌要求取合适大小的组织, 随后放入无菌研磨棒中, 加入 2 ml 无菌 PBS 进行充分研磨, 然后静置 5 min。上述操作按照需氧或厌氧条件, 分别在生物安全柜或厌氧培养箱中操作完成。

2. 准备预培养并延长预培养时间

- 2.1 准备试剂和器材: 按照实验需求, 将若干数量的 100 ml 锥形瓶瓶口用牛皮纸封口, 并将锥形瓶装入高压袋中, 密封后进行 121 °C, 20 min 高压灭菌。
- 2.2 准备血培养瓶: 血培养瓶分为两种条件, 分别为厌氧和需氧条件, 因需延长培养时间, 而商品化的血培养瓶为密封状态, 因此需氧条件下的血培养瓶用 100 ml 锥形瓶代替。需氧条件在生物安全柜中操作, 用注射器抽取 40 ml 需氧血培养瓶中培养液于无菌 100 ml 锥形瓶中, 然后分别依次加入 5 ml 无菌脱纤维绵羊血和 5 ml 无菌瘤胃液 (Lagier *et al.*, 2015), 最后用无菌牛皮纸封口 (并非密封, 可保持需氧状态)。厌氧条件在厌氧培养箱中操作, 将厌氧血培养瓶中分别依次加入 5 ml 无菌脱纤维绵羊血和 5 ml 无菌瘤胃液。
- 2.3 加样: 取 0.5 ml 静置后的样本上清, 加入各个条件的血培养瓶中。
- 2.4 定期取样: 血培养瓶预培养共 27 天, 培养条件为需氧或厌氧, 37 °C。分别在 0、3、6、9、15、21、27 天 7 个时间点抽取各个条件下的血培养瓶中的混合菌液 2.5 ml, 其中 2 ml 进行保藏, 冻存于 -80 °C。剩余 0.5 ml 混合菌液进行

后续分纯。

- 2.5 补充培养基条件：补充培养基培养即在抽取混合菌液 2.5 ml 后补充加入等体积的原始培养基 (血培养瓶营养液+羊血+瘤胃液)，以保证养分始终保持充足状态，其他培养条件与空白组相同 (Chang *et al.*, 2019)。
- 2.6 添加抑制剂条件：抑制剂条件使用的是抑制剂 CHIR-090 (北京百奥莱德公司)，其作用是抑制以大肠杆菌为主的部分革兰氏阴性菌。将 20mg 的抑制剂 CHIR-090 溶解于 1 ml 过滤除菌后的 DMSO (现配现用)，彻底溶解后，加入到配制好的预培养的血培养瓶中 (抑制剂浓度=400 µg/ml)，进行延长预培养时间培养，定期取样及培养条件同前，后续不再添加抑制剂 (Hou *et al.*, 2019)。

3. 混合菌液稀释涂布

- 3.1 配制培养基：根据实验目的配制不同营养成分的固体和液体培养基 (例如适合肠道菌群生长的 YCFA 培养基) (Duncan *et al.*, 2002; Browne *et al.*, 2016)。其中厌氧条件下培养的培养基需在厌氧箱中提前放置 2 天。
- 3.2 混合菌液稀释涂布：将步骤 2.4 中剩余的 0.5 ml 预培养混合菌液中抽取 100 µl 依次倍比稀释至 10^{-10} 倍，然后每个稀释梯度抽取 100 µl 添加到固体培养基上，用涂布棒均匀涂开。其中需氧条件在生物安全柜中操作，操作结束后放置 37 °C 恒温培养箱中培养 1 天。厌氧条件在厌氧箱中操作，操作结束后同样在厌氧箱中 37 °C 条件下培养 3 天。

4. 挑取单克隆及液体扩增

- 4.1 挑取单克隆：待各个条件的固体平板培养好后，选取单克隆数目在 100~500 的固体平板进行挑取单克隆。单克隆的挑取方式为：根据单克隆的大小、颜色、形态、菌落光滑程度，每种单克隆挑取 2~3 个。
- 4.2 单克隆液体扩增：提前将液体培养基加入到高压无菌的试管中，每个试管中加入 5 ml 培养基。将挑取的单克隆添加到试管中，稍摇匀后放入对应的培养条件下进行培养。其中需氧条件在生物安全柜中操作，操作结束后放置 37 °C 恒温培养箱中培养 1 天。厌氧条件在厌氧箱中操作，操作结束后同样在厌氧箱中 37 °C 条件下培养 3 天。

5. 细菌分纯及保藏

- 5.1 细菌平板划线：待细菌液体扩增培养好之后，将每株细菌在对应的固体培养基上

三区划线，然后将固体培养基放入厌氧箱或 37 °C 恒温培养箱进行培养，其中需氧培养 1 天，厌氧 3 天。

5.2 细菌保藏：将剩余单克隆液体扩增菌液按照 20%甘油+80%菌液的比例进行甘油保菌，每株细菌保藏 2 支，做好标记，最后冻存于-80 °C。

6. 细菌鉴定

6.1 MALDI-TOF 质谱鉴定：步骤 5.1 三区划线平板培养好之后，用牙签挑取少量单克隆轻轻涂在 MALDI-TOF 质谱板对应的检测位置，然后滴加裂解液质谱基质，待基质晾干后上机检测 (视频 1)。检测结果 ≥ 9 为可信， < 9 为不可信 (注：不同型号质谱仪对于结果衡量标准不同)，若不可信则重新复苏对应细菌进行 16S rRNA 基因测序鉴定。



视频 1. 细菌质谱鉴定

6.2 16S rRNA 基因测序鉴定：对 MALDI-TOF 质谱鉴定不可信的细菌进行重新复苏，然后提取 DNA 进行 16S rRNA 基因测序，根据 Blast 比对结果鉴定细菌种类。

6.3 新菌鉴定：如果 Blast 比对 Identity $< 98.65\%$ ，则可能是一个新种 (Lagier *et al.*, 2018)，则需从进化、生理、生化、脂肪酸等方面进行细菌鉴定。

注意事项

1. 取样时虽然有些样本 (例如粪便样本) 难免会违反无菌原则，但是操作时也应尽量保持干净的环境，选择洁净的取样环境，并对房间进行消毒处理，利用专业无菌的粪便收集器进行收集样本，并用无菌棒进行样本采集。

2. 厌氧血培养瓶中加羊血和瘤胃液过程中要时刻注意不要将外部气体带入瓶内。
3. 部分单克隆相邻较近，挑取过程中应注意不要污染。
4. 抑制剂 CHIR-090 要现配现用，以免失效。
5. 涂 MALDI-TOF 质谱鉴定的孔板时，避免细菌涂抹太厚或不均匀。

溶液配方

YCFA 培养基

	名称	英文/化学名	每 100 ml 含量
试剂 1	血红素	haemin	1 mg
	半胱氨酸	cysteine	0.1 g
	胰蛋白胨	Tryptone	1 g
	酵母提取物	yeast extract	0.25 g
	碳酸氢钠	NaHCO ₂	0.40 g
	磷酸氢二钾	K ₂ HPO ₄	0.045 g
	七水合硫酸镁	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.009 g
	氯化钙	CaCl ₂	0.009 g
	磷酸二氢钾	KH ₂ PO ₄	0.045 g
	氯化钠	NaCl	0.09 g
试剂 2	琼脂粉 (固体培养基)	Agar power	1.5 g
	刃天青	resazurin	0.1 mg
	生物素	biotin	1 µg
	钴胺素	cobalamin	1 µg
	对氨基苯甲酸	p-aminobenzoic acid	3 µg
	叶酸	folic acid	5 µg
试剂 3	吡哆醛	pyridoxmine	15 µg
	硫胺素	thiamine	5 µg
	核黄素	riboflavin	5 µg
	葡萄糖	glucose	25 mM

注:

1. 试剂 1 中的试剂为粉末，在配制过程中按照配方比例直接添加到容器中，然后加入 800 ml 的去离子水。
2. 试剂 2 中的试剂需分别配制成溶液，具体配制方法为将一定重量的固体粉末溶解于一定体积的去离子水中，然后在高压灭菌前按照自己配制的溶液浓度和配方比例添加一定体积的配制溶液，配制好的溶液放于-20 °C 保存。试剂 1 和试剂 2 中的试剂都添加完毕后进行 121 °C，20 min 高压灭菌。
3. 试剂 3 中的试剂不耐高温，因此需高压过后添加。具体配制方法同试剂 2，同样配制成溶液，按照配方比例添加，但是添加前注意需用过滤器进行过滤灭菌。配制好的溶液放于-20 °C 保存。

致谢

本研究得到了国家自然科学基金重点项目 (No. 81790632)、国家自然科学基金 (No. 31970863) 和广州创新领军团队计划 (No. 201809010014) 项目支持。

参考文献

1. Browne, H., Forster, S., Anonye, B., Kumar, N., Neville, B., Stares, M., Goulding, D. and Lawley, T. (2016). [Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation.](#) *Nature* 533: 543-546.
2. Chang, Y., Hou, F., Pan, Z., Huang, Z., Han, N., Bin, L., Deng, H., Li, Z., Ding, L., Gao, H., Zhi, F., Yang, R. and Bi, Y. (2019). [Optimization of culturomics strategy in human fecal samples.](#) *Front Microbiol* 10: 2891.
3. Duncan, S. H., Hold, G. L., Harmsen, H. J. M., Stewart, C. S. and Flint, H. J. (2002). [Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov.](#) *Int J Syst Evol Microbiol* 52(6): 2141-2146.
4. Hou, F., Chang, Y., Huang, Z., Han, N., Bin, L., Deng, H., Li, Z., Pan, Z., Ding, L., Gao, H., Yang, R., Zhi, F. and Bi, Y. (2019). [Application of LpxC enzyme inhibitor to inhibit some fast-growing bacteria in human gut bacterial culturomics.](#) *BMC Microbiol* 19(1): 308.

5. Lagier, J. C., Hugon, P., Khelaifia, S., Fournier, P. E., La Scola, B. and Raoult, D. (2015). [The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota.](#) *Clin Microbiol Rev* 28(1): 237-264.
6. Lagier, J. C., Dubourg, G., Million, M., Cadoret, F., Bilen, M., Fenollar, F., Levasseur, A., Rolain, J. M., Fournier, P. E. and Raoult, D. (2018). [Culturing the human microbiota and culturomics.](#) *Nat Rev Microbiol* 16: 540-550.